

氏 名	阿部 哲朗
学 位 の 種 類	博士（創薬科学）
学 位 記 番 号	医薬保博甲第 171
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 22 日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第 4 条第 1 項）
学位授与の題目	植物に由来する健康機能性成分の探索

論 文 審 査 委 員	主査 佐々木 陽平
	副査 太田 富久
	副査 後藤（中川）享子
	副査 小谷 明
	副査 吉村 智之

学位論文要旨

Abstract

The purpose of this study was to elucidate the health function of edible plants and to explore compounds involved in health function. I searched new compounds for strawberry (*Fragaria ananassa*) and burdock (*Arctium lappa*), and studied anti-obesity action and immunostimulatory action, respectively. And I evaluated the anti-stress effect on *Gynura bicolor*. Isolation of the compound was carried out by fractionating and purifying hot water extract of strawberry and burdock by using chromatographs, the structure was determined from 1D and 2D-NMR spectral data and literature by comparison. The polyphenols isolated from strawberry were allowed to act on rat white adipocytes to evaluate fat accumulation inhibitory activity. The dicaffeoylquinic acid derivative isolated from burdock was evaluated the influence on human immune response-related cytokine using human monocytic cell THP-1. *Gynura bicolor* was administered to rats in a single dose, and the blood corticosterone concentration at the time of stress application was examined. The results of these experiments are as follows. A new compound **8** and ten known compounds were isolated from strawberries. Two new compounds **14** and **15** and two known compounds were isolated from burdock. It was suggested that the anti-obesity action of strawberry, the immunostimulatory activity of burdock and antistress action of *Gynura bicolor* may be possible.

要旨

【背景】

近年、日本においてストレスの増加や高齢化、医療技術の進歩にともない医療費の高騰が問題となっている。そこで、病気になる前に自ら健康管理を行うセルフメディケーションを政府が推奨している。セルフメディケーションの一環として平成 27 年、消費者庁は機能性表示食品制度を導入した。この制度は健康機能に関するエビデンスと安全性に関するエビデンスを届け出ることによってその食品に健康維持・増進機能の表現を可能にしている。これまでに 1000 件以上の機能性表示食品が届け出られているが、機能性の関与成分が重複しており食材としてはまだまだ少ないことが実情である。さらに、生鮮食品においては長い食経験から安全性が十分認められているにもかかわらず、機能性が解明されていない食材が多々存在している。そこで今回筆者は石川県で栽培されている植物に注目し、食経験が長くあるものを選出したうえで事前のスクリーニングからイチゴ (*Fragaria ananassa*)・ゴボウ (*Arctium lappa*)・金時草 (*Gynura bicolor*) について健康機能の解明と機能性の関与成分の探索を行った。

【方法】

- ・イチゴの脂肪蓄積阻害作用成分の探索

イチゴエキスをラットに投与することで体重増加が抑えられたという予備実験からイチゴの抗肥満

作用に注目し、ラット白色脂肪細胞を用いた脂肪蓄積阻害活性を指標としてイチゴの可食部の熱水抽出物（90℃・60分）をカラムクロマトグラフ・HPLCにより成分探索を行った。単離した化合物はマススペクトル、1D・2D-NMR スペクトル及び文献比較により構造を決定した。また、単離した化合物を細胞分化後の脂肪細胞に添加し72時間培養後の脂肪蓄積への影響を Oil Red O 染色後の540nmの吸光度を測定することにより評価した。

・ゴボウの免疫賦活作用を有する caffeoylquinic acid 誘導体の探索

ゴボウの果実が「牛蒡子」として消炎・解熱・解毒を目的とした漢方製剤に処方されていることから、食用部の根を熱水抽出（90℃・30分・2回）し、カラムクロマトグラフ・HPLCにより DPPH ラジカル消去活性を指標に成分探索を行った。単離した化合物はマススペクトル、1D・2D-NMR スペクトル、CD スペクトル及び文献比較により構造を決定した。単離した化合物について DPPH ラジカル消去活性試験により抗酸化活性を測定した。次にヒト単球系細胞 THP-1 細胞に単離した化合物を作用させ 100ng/mL の LPS 刺激時および非刺激時に産生される炎症関連サイトカイン（TNF- α , IL-6）の濃度を ELISA 法で調べた。

・金時草の抗ストレス効果

金時草が夏バテ対策に食されること、夏バテの一因にストレスがあることからマウスを用いて抗ストレス効果を検討した。マウスを4群（自由行動群・ストレス負荷群・ストレス負荷+金時草摂取群・ストレス負荷+強壮剤摂取群）に分け、ストレス負荷2時間30分後の血中コルチコステロン濃度を測定した。なお金時草及び強壮剤は 1000mg/kg を単回投与した。

【結果】

・イチゴの脂肪蓄積阻害作用成分の探索

10種の既知化合物と新規化合物 quercetin-3-*O* - β -glucuronyl-(2 \rightarrow 1)- β -D-xyloside (**8**)を単離した (Figure 1)。脂肪蓄積阻害活性評価は今回単離した化合物においてはタンニン類が他のポリフェノールに比べて強い活性を示したが、混合物に比べて阻害活性が低下した。このことから、イチゴの抗肥満作用は複数種のポリフェノールが相加的または相乗的に機能しているものと考えられた。

・ゴボウの免疫賦活作用を有する caffeoylquinic acid 誘導体の探索

2種の新規 dicaffeoylquinic acid 誘導体 1-*O*-,4-*O*-dicaffeoyl-3-*O* -(2-hydroxysuccinyl)quinic acid (**14**)、1-*O* -,5-*O* -dicaffeoyl-3-*O* -(2-hydroxyl succinyl)quinic acid (**15**) (Figure 2) を既知化合物2種とともに単離した。これらの化合物は dicaffeoylquinic acid にリンゴ酸が結合した化合物で天然物として初めての報告である。これらの化合物は DPPH ラジカル消去活性試験において IC₅₀ =6.31~6.34 と ascorbic acid の約2倍の活性を示した。また、ヒト単球系細胞 THP-1 細胞によるサイトカイン産生試験において、LPS(+)の条件下では TNF- α と IL-6 はともに添加24時間後の産生量が最も多かった。そこで LPS(+)の条件下において24時間後について最終濃度 5, 10, 50 μ M における TNF- α と IL-6 の濃度を調べた。結果、化合物 **12** 及び **15** は濃度依存的に TNF- α と IL-6 の産生を上昇させ、化合物 **14** は TNF- α に対し選択性を示した。TNF- α と IL-6 は免疫応答開始のシグナルを担う因子であることを考慮すると、これらの化合物が単球系免疫応答を上昇させる可能性が考えられた。

・金時草の抗ストレス効果

自由行動群のマウスに対してストレス負荷群のマウスではいずれも血中コルチコステロン濃度は上昇した。ストレス負荷群の血中コルチコステロン濃度が約 $6\mu\text{g/mL}$ に対し、金時草摂取群では約 $5\mu\text{g/mL}$ と穏やかにコルチコステロン濃度の上昇を抑えた。このことから金時草にはストレスの蓄積を軽減する作用を有すると考えられた。

【結論】

in vitro 試験により、①イチゴ由来ポリフェノール群がイチゴの抗肥満作用の機能性に関与していること、②ゴボウ由来 dicaffeoylquinic acid 誘導体が免疫賦活作用の機能性に関与していることが示唆された。また、マウスによる in vivo 試験により金時草が抗ストレス作用を有することが示された。今回得られた知見は機能性表示食品としてのエビデンスを構築するための最初の研究であると考えられる。

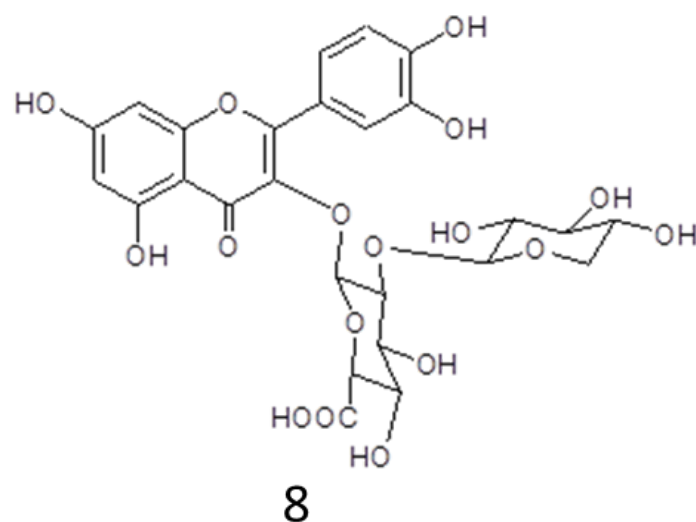
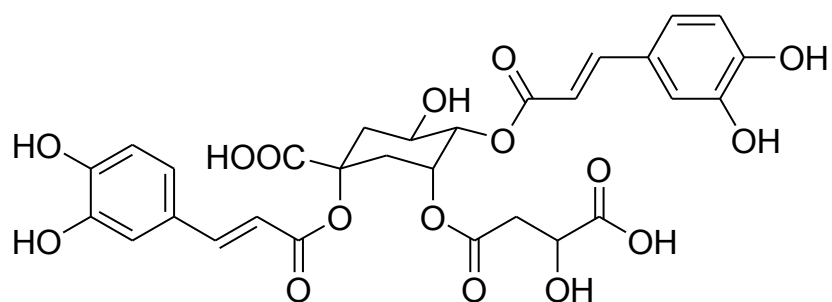
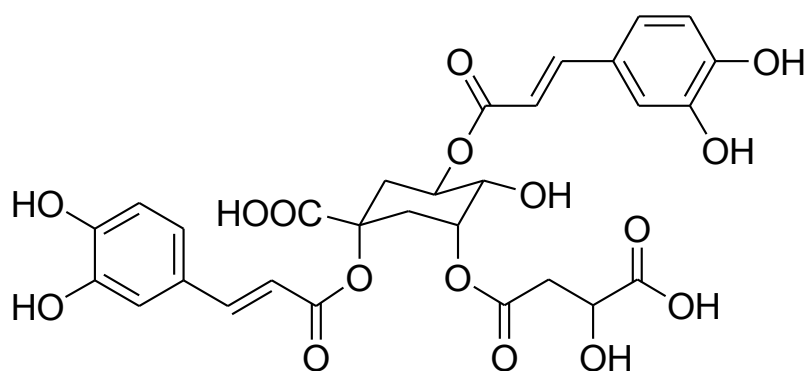


Figure 1. The structure of compound 8 isolated from *Fragaria ananassa*.



14



15

Figure 2. The structures of Compound **14** and **15** isolated from *Arctium lappa*.

審査結果の要旨

近年、日本では肥満やストレス社会に起因する生活習慣病が増加傾向にあり、これに伴う医療費の高騰が社会問題となっている。このような背景からセルフメディケーションが注目されている。現在、消費者庁による機能性表示食品制度などが推進される一方、これまでの豊富な食経験により高い安全性が保証されている食材であっても機能性の解明及び関与成分の探索が不十分な食物が多い。そこで本研究では、研究対象として石川県で栽培されている農産物に着目した。スクリーニングからイチゴ (*Fragaria ananassa*) を選定し、健康機能の解明と機能性に関与する成分の探索を行った。まずイチゴエキスをラットに投与することで体重増加が抑えられることを見だし、抗肥満作用を有することを予測した。そこで *in vitro* 実験系であるラット白色脂肪細胞による脂肪蓄積阻害活性を指標としてイチゴ可食部の熱水抽出物から活性成分の探索を行った。単離精製後、各種スペクトルの解析の結果、新規化合物 quercetin-3-*O*- β -glucuronyl-(2 \rightarrow 1)- β -D-xyloside および 10 種類の既知化合物を得た。これら各化合物個々の活性試験では強い作用を示さないことから、イチゴの脂肪蓄積阻害活性は単一の化合物によるものではなく、複数のイチゴ由来ポリフェノールによる相加作用によるものであると予想した。これらの成果は学術的な重要性を含むことから、審査委員会は本論文が博士（創薬科学）に値すると判断した。